

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 08 JAN 2001  
WIPO PCT

DE00/3444

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

EU

**Aktenzeichen:** 199 46 142.2

**Anmeldetag:** 27. September 1999

**Anmelder/Inhaber:** Bundesrepublik Deutschland, letztvertreten durch  
den Präsidenten des Paul-Ehrlich-Instituts Prof. Dr.  
R. Kurth, Langen/DE

**Bezeichnung:** Gentransfer in humane Lymphocyten mittels  
retroviraler scFv-Zelltargeting Vektoren

**IPC:** C 12 N, A 61 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 26. Oktober 2000  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

*[Handwritten signature]*

Wehner



## Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft den Gentransfer in humane T-Zellen mittels neuer retroviraler scFv-Zelltargeting Vektoren und die Verwendung dieser Vektoren zur Behandlung T-Zell-assoziierter Krankheiten.

## Gentransfer in humane Lymphocyten mittels retroviraler scFv- Zelltargeting Vektoren

- 10 Die Erfindung betrifft den Gentransfer in humane Lymphocyten, insbesondere T-Lymphocyten mittels retroviraler scFv-Zelltargeting-Vektoren und die Verwendung dieser Vektoren zur Gentherapie, Impftherapie oder Diagnostik, insbesondere zur Therapie T-Zell-assoziiierter Krankheiten.
- 15 Die Mehrheit der retroviralen Vektoren, die in der gentherapeutischen Forschung zur Zeit benutzt werden, stammen vom amphotropen Maus-Leukämie-Virus (MLV) ab. Der Wirtszellbereich des amphotropen MLV wird durch das Oberflächenhüllprotein (SU) bestimmt, das vom env-Gen codiert wird. Die Proteinprodukte des env-Gens bilden die äußere Hülle des retroviralen Vektors. Die SU-Proteine interagieren mit, d.h. sie binden an
- 20 ein bestimmtes Protein (Rezeptor) auf der Oberfläche der Wirtszelle. Die env-Genprodukte des amphotropen MLV erlauben den Gentransfer in eine große Anzahl unterschiedlicher Säugerzellen. Ein selektiver Gentransfer in bestimmte Zell- oder Gewebetypen des Menschen oder anderer Säuger ist mit amphotropen MLV-Vektoren aber nicht möglich, weil der Rezeptor für die MLV-Hüllproteine auf der Oberfläche der Säugerzellen, welches den Eintritt von amphotropen MLV-Vektoren und den Gentransfer vermittelt, auf fast allen diesen Zellen zu finden ist. Der Wirtszellbereich des amphotropen MLV ist daher nicht spezifisch.

- 
- 30 Eine Wirtszellspezifität ist z.B. für den gentherapeutischen Einsatz jedoch von Vorteil, da bei einer Gentherapie außerhalb des Organismus (*ex vivo*) (Anderson et al. 1992; Yu et al., 1997) aufwendige Aufreinigungen von Zellen vermieden werden. Für den Therapie-, Diagnostik- oder Impf-Einsatz *in vivo* ist erwünscht, daß die retroviralen Vektoren gezielt die gewünschten Wirtszellen ansteuern und anschließend das therapeutische Gen übertragen. Eine Einengung des Wirtszellbereichs des amphotropen MLV konnte durch

Modifikation des Oberflächenhüllproteins erreicht werden. Eine Modifikation des Oberflächenhüllproteins wurde durch die Fusion mit einer Hormondomäne durchgeführt. Es fand eine Transduktion der Zellen statt, die den spezifischen Hormonrezeptor trugen (Kasahara et al., 1995). Ferner wurde das Oberflächenhüllprotein durch Fusion mit einem einkettigen Antikörperfragment (*single chain variable fragment*, nachfolgend auch „scFv“ bezeichnet) modifiziert. Das Fragment repräsentierte die antigenbindende Domäne eines Antikörpers und ist ein Fusionsprotein, das aus den variablen Domänen Vh und Vl eines monoklonalen Antikörpers zusammengesetzt ist. Die beiden Domänen sind über ein Glycin- und Serin-Oligopeptid [-(ser-gly4)3-gly-] verknüpft, das die korrekte Faltung des Fusionsproteins ermöglicht (Huston et al., 1991; Whitlow et al., 1991). Alle bisher durchgeführten Modifikationen des MLV-Oberflächenhüllproteins mit einem scFv zeigten, daß es zwar zu einer Bindung der Vektoren an die Wirtszelle kam, nicht jedoch zu einem Eintritt in die Zelle (Russel et al., 1993). Weiterhin ist bekannt, daß das Oberflächenhüllprotein des MLV generell keine umfangreichen Modifikationen erlaubt (Cosset et al., 1995). Modifikationen, bei denen ein Teil der Bindungsdomäne des MLV-SU-Proteins ersetzt wurde, führten oft zu einer inkorrekten Prozessierung und somit zu einem defekten Transport des SU-Proteins an die Zelloberfläche (Weiss et al., 1993; Morgan et al., 1993; Russel et al., 1993). Die Entwicklung zellspezifischer retroviraler Vektoren auf Basis des MLV mit veränderten Oberflächenhüllproteinen ist daher wenig erfolgversprechend.

Retrovirale Vektoren auf Basis des Milznekrosevirus SNV („Spleen Necrosis Virus“) sind für einen gezielten Gentransfer in z.B. humane Zellen geeigneter, da das Oberflächenhüllprotein des SNV umfangreiche Modifikationen erlaubt und auch dann noch korrekt prozessiert wird (Martinez und Dornburg, 1995; Chu und Dornburg, 1994, 1995; Jiang et al., 1998). Zur Herstellung derartiger Vektoren benötigt man mindestens zwei Komponenten. Zum einen ist ein sog. Expressionskonstrukt herzustellen, das eine Verpackung in und den Transfer durch einen Retrovirus erlaubt. Das Expressionskonstrukt umfaßt ein kodierendes DNA-Fragment des gewünschten Genprodukts, z.B. ein Gen für die Gentherapie oder als Impfstoff. Das Expressionskonstrukt muß eine Nukleotidsequenz umfassen, die als Verpackungssignal psi ( $\psi$ ) bezeichnet wird und die effiziente Verpackung der mRNA in retrovirale Partikel steuert. Ferner benötigt man eine Verpackungs- oder

Helferzelle, welche die gag-, pol- und env-Genprodukte des SNV bereitstellt, ohne daß die gag-, pol- und env-Gene in ein Retrovirus verpackt werden können. Die in der Verpackungszelle befindlichen gag-, pol- und env-Gene müssen psi-negativ sein. Nach Überführung des Expressionskonstruktes durch Transfektion der entsprechenden Plasmid-DNA in die Verpackungszellen werden retrovirale Partikel in den Zellkulturüberstand  
 5 abgegeben, die das Expressionskonstrukt enthalten und nur dieses, nicht jedoch die gag-, pol-, und env-Gene in die Zielzelle überführen können. Diese Vektoren sind vermehrungsunfähig und durchlaufen lediglich eine Replikationsrunde. Das allgemeine Verfahren zur Herstellung von vermehrungsunfähigen retroviren Vektoren ist Stand der  
 10 Technik (Russel et al., 1993; Cossét et al., 1995; Weiss et al., 1993; Morgan et al., 1993; Martinez und Dornburg, 1995; Chu und Dornburg, 1994, 1995; Jiang et al., 1998).

Auch der Tropismus (Wirtszellspezifität) des Milznekrosevirus wird durch das Oberflächenhüllprotein (SU-Protein) bestimmt, das vom env-Gen des SNV codiert wird.  
 15 Das Wildtyp-SNV-Oberflächenhüllprotein läßt keinen selektiven Gentransfer in bestimmte Zellen oder Gewebe des Menschen zu, da das spezifische Empfängerprotein (Rezeptor) nicht auf der Oberfläche von humanen Zellen vorhanden ist (Dornburg, 1995). Deshalb wurde von Dornburg et al. ein Verfahren entwickelt, um das SU-Protein des SNV gegen die  
 20 antigenerkennende Domänen von Antikörpern zu ersetzen. Diese [SNV-scFV-Env]-Vektoren mit vier bisher bekannten unterschiedlichen scFv waren in der Lage, das psi-positive Reportergen, die bakterielle  $\beta$ -Galaktosidase, in die ausgewählte humanen Zielzellen zu übertragen (Chu et al., 1994; Chu et al., 1995; Chu und Dornburg, 1997). Im  
 einzelnen handelte es sich um zwei scFv, die gegen unbekannte Oberflächenantigene auf Brust- und Colocarzinom Zellen exprimiert werden (Chu et al., 1995; Chu und Dornburg,  
 25 1997; Jiang et al., 1998), um ein scFv, das gegen den humanen Transferrinrezeptor gerichtet ist und um ein scFv, das das CD34 Oberflächenantigen erkennt. Es wurde eine Verpackungszelllinie (DSH-CXL) entwickelt, die sowohl die psi-negativen SNV-Gene gag, pol und env als auch das psi-positive Reportergen-Expressionskonstrukt (pCXL) enthält.  
 Nach Transfektion der Verpackungszelle mit der Plasmid-DNA eines weiteren env-  
 30 Expressionsgens (pTC53 [Expressionsvektor pTC53 und pTC53zeo Jiang et al., 1998]), bei dem das gesamte Oberflächenhüllprotein gegen ein einkettiges Antikörperfragment (scFv) ersetzt wurde, wurden retrovirale Vektoren in den Zellüberstand abgegeben, die auf

7

ihrer Oberfläche neben dem Wildtyp-Oberflächenhüllprotein auch das chimäre [scFv-Env]-Oberflächenprotein trugen. Mit Hilfe dieser Vektoren konnte das Reportergen in die für die scFv-spezifischen Zielzellen transferiert werden. Bei dem von Dornburg et al. beschriebenen Verfahren zur Herstellung zellspezifischer retroviraler Vektoren ist Fakt, daß

5 nur bereits bekannte und klonierte scFv verwendet werden können.

DE 19752854 A1 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung zelltypspezifischer, von SNV-abgeleitete Targeting-Vektoren. Bisher sind 4 scFv-SNV-Targeting-Vektoren beschrieben worden. Diese sind gegen Tumormarker, den Transferrinrezeptor und gegen das CD34-Oberflächenantigen gerichtet (Chu & Dornburg, 1995, 1997, Jiang et al., 1997). Dabei

10 wurden die scFv von monoklonalen Antikörpern (mAb) abgeleitet. Weiterhin sind bisher Pseudotypvektoren des Typs MLV (HIV) zur spezifischen Transduktion humaner CD4-positiver T-Zellen beschrieben worden (Schnierle & Stitz et al., 1997).

15 Allerdings sind bisher noch keine Vektoren beschrieben worden, die mit hoher Selektivität CD4-unabhängig humane T-Zellen transduzieren können.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher T-Zell-spezifische Vektoren bereitzustellen, die CD4-unabhängig humane T-Zellen transduzieren können.

20

Die Aufgabe wird gelöst durch Zelltargeting-Vektoren, die eine DNA-Sequenz enthalten, die ein einkettiges Antikörperfragment (single chain variable fragment, scFv) codiert, wobei das einkettige Antikörperfragment eine Aminosäuresequenz gemäß einer der Figuren 1 bis 5 hat.

25

In einer bevorzugten Ausführungsform enthält der erfindungsgemäße Zelltargeting-Vektor weiterhin eine DNA-Sequenz, die einen SNV-env Leader gemäß einem der Figuren 1 bis 5 codiert. Die erfindungsgemäßen Zelltargeting-Vektoren sind T-Zell-spezifisch, d.h. die Vektoren induzieren selektiv CD4-unabhängig humane T-Zellen.

30

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform ist der Zelltargeting-Vektor vom SNV (Milznekrosevirus) abgeleitet, besonders bevorzugt ist der von SNV abgeleitete Vektor pTC53.

- 5 In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung enthalten die erfindungsgemäßen Zelltargeting-Vektoren ein therapeutisches Gen. Die Erfindung betrifft daher auch die Verwendung der erfindungsgemäßen Zelltargeting-Vektoren zur Gentherapie, Impftherapie oder Diagnostik.

- 10 Mit den erfindungsgemäßen scFv-Vektoren, stehen die ersten scFv- Zelltargeting-Vektoren zur Verfügung, die mit hoher Selektivität und unterschiedlich hoher Effizienz CD4-unabhängig humane T-Zellen transduzieren können.

- Mittels der erfindungsgemäßen Vektoren ist es möglich folgende T-Zell-assoziierte  
15 Krankheiten zu therapieren:

- (i) Schwere kombinierte Immunschwäche (SCID). Hierbei handelt es sich um einen Defekt des Adenosin-Desaminase-Gens (ada) oder des für die Thyrosinkinase JAK-3 kodierenden Gens (Macchi et al., 1995). Als therapeutisches Gen wird das intakte ada-Gen mittels der erfindungsgemäßen Vektoren in die T-Zellen transferriert.

- (ii) Erworbene Immunschwäche (AIDS) wird durch die HIV-1 Infektion hervorgerufen. Therapeutische Gene sollen die Replikation oder Integration des Virus inhibieren. Als therapeutische Genprodukte für die intrazelluläre Immunisierung sind dabei Ribozyme, Köder-RNA, transdominant negative Mutanten von HIV-Proteinen oder Antikörperfragmente geeignet (Chang et al., 1994, Ramenzani et al., 1997, Smith et al., 1996, Leavitt et al., 1996, Duan et al., 1995, Levy-Mintz et al., 1996). Diese therapeutischen Gene werden bei der erfindungsgemäßen Verwendung der neuen Zelltargeting-Vektoren in die T-Zellen HIV-1 infizierter Patienten transferriert.

30 Es konnte gezeigt werden, daß mittels der erfindungsgemäßen Vektoren (z.B. Vektoren, enthaltend das in Fig. 1 gezeigte scFv 7A5; nachfolgend als 7A5-Vektoren bezeichnet) humane Makrophagen mit einer Effizienz von 95%

transduziert werden. Somit ist mittels dieser 7A5-Vektoren der Transfer therapeutischer Gene auch in HIV-1 infizierte Makrophagen möglich.

(iii) T-Zell assoziierte Lymphome.

5

Die erfindungsgemäßen (scFv-SNV-Env)-Targetingvektoren, enthaltend eine DNA-Sequenz codierend ein einkettiges Antikörperfragment (single chain variable fragment, scFv), wobei das einkettige Antikörperfragment eine Aminosäuresequenz (oder ein Fragment) gemäß einer der Figuren 1 bis 5 hat, ermöglichen selektiv eine Transduktion humaner T-Zelllinien und zum Teil aus dem Blut isolierter primärer Lymphocyten.

Überraschenderweise zeigen die erfindungsgemäßen Vektoren eine um das Vielfache erhöhte Selektivität für humane T-Zellen im Vergleich zu anderen humanen Zellen. Die 7A5-Vektoren, d.h. die Vektoren, die das einkettige Antikörperfragment gemäß Fig. 1 oder einen Teil hiervon kodieren, zeigten eine bis um den Faktor 1000 erhöhte Selektivität für humane T-Zellen im Vergleich zu anderen humanen Zellen besitzt (s. Tabelle 2) und eine 4-5 fach erhöhte Selektivität für T-Zellen im Vergleich zu B-Zellen.

In Tabelle 1 sind 5 scFv (im einzelnen: 7A5, K6, 7B2, 7E4, 6C3) und ihre Vektortiter auf humanen T-Zellen (C8166), D17 Zellen (Hunde Osteosarkom-Zelllinie, permissiv für SNV) und HeLa Zellen (humane Zervixkarzinom-Zelllinie) dargestellt.

In Tabelle 2 sind die Vektortiter von 7A5-Vektoren dargestellt. Aus diesen Daten ist die Effizienz und Spezifität für humane T-Zellen erkennbar. Mittels dieser 7A5-Vektoren konnten auch mittels gentechnisch veränderter SNV-Vektoren ruhende T-Zellen und sogar humane Makrophagen sehr effizient transduziert werden.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung und sind nicht als einschränkend aufzufassen:

30



### Beispiel 1:

#### Bestimmung der Vektortiter der fünf selektionierten scFv auf D17-, C8166- und HeLa-Zellen.

5

Hierzu wurden die Zellkulturüberstände in drei Verdünnungsstufen (1000µl, 100µl und 10µl) in einem Gesamtvolumen von 1000µl unter Zugabe von 30µg/ml Polybren auf den Zellen (2 x 10<sup>5</sup> D17 und HeLa, 5 x 10<sup>5</sup> C8166) titriert. Nach 1,5-2 h Inkubationszeit wurde der vektorhaltige Überstand durch frisches Medium ersetzt.

10

Nach 48 h wurde zur Detektion der transduzierten Zellen eine X-gal Anfärbung durchgeführt (Mikawa et al., 1992) und die blauen Zellen gezählt. Tab. 1 zeigt die Vektortiter der fünf selektionierten scFv auf D17-, C8166- und HeLa-Zellen.

15 Die Titration auf D17 (Hundeosteosarkomzelllinie, Watanabe et al., 19) dient als positiv-Kontrolle für die Vektorproduktion. Der Titer von  $>10^6$  i.E./ml zeigt, dass alle 5 scFv-Verpackungszellklone mit ungefähr gleicher Effizienz Vektorpartikel in den Zellkulturüberstand abgeben.

20 Die Titer auf C8166 Zellen schwanken zwischen  $10^3$  und  $10^6$  i.E./ml je nach scFv während die Transduktion auf HeLa Zellen keinen nennenswerten Titer ergab. Diese Tatsache deutet auf eine hohe Selektivität für humane T-Zellen aller fünf scFv-Vektoren hin. Die 7A5Vektoren transduzieren am effizientesten humane T-Zellen (Tabelle 1).

ScFv	Titer (i.E./ml)		
	D17	C8166	HeLa
7A5	$>10^6$	$1 \times 10^6$	$<10^2$
K6	$>10^6$	$2,5 \times 10^5$	$<10^1$
7B2	$>10^6$	$2 \times 10^4$	$<10^1$
7E4	$>10^6$	$2 \times 10^3$	$<10^1$
6C3	$>10^6$	$2 \times 10^3$	$<10^1$

**Tab. 1:** Vektortiter der fünf scFv-Vektoren

### Beispiel 2:

10

#### Weitere Charakterisierung der Vektoren

Zur genaueren Charakterisierung werden weitere Transduktionsexperimente mit den Vektoren durchgeführt. In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der 7A5-Vektoren dargestellt.

	Titer (i.E./ml)									
	D17	HeLa	TE671	HT1080	293T	C8166	Molt4/8	Jurkat	A301	huPBMC
wt	$>10^6$	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$
7A5	$>10^6$	$<10^2$	$<10^1$	$<10^1$	$<10^2$	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^6$	$3 \times 10^5$	$1 \times 10^5$	$7,5 \times 10^4$

**Tab. 2:** Transduktion verschiedener Zelltypen mittels 7A5- und Wildtyp-Vektoren

Die Transduktionen wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Als Kontrolle wurden alle Zellen mit Wildtyp-Vektoren (wt) transduziert. Hierbei handelt es sich um Vektorpartikel, die nur das Wildtyp-SNV-Env-Protein und kein scFv besitzen. Diese werden von der Ausgangs-Verpackungszelllinie DSH-cx1 (Chu & Dornburg, 1995, Jiang et al., 1998) in den Kulturüberstand abgegeben. Erwartungsgemäß konnten diese Vektoren humane Zellen nicht transduzieren. Nur die für sie permissiven D17 Zellen konnten mit hoher Effizienz transduziert werden.

Die Titration mit 7A5-Vektoren zeigte eine effiziente Transduktion von mehreren humanen T-Zelllinien (C8166, Molt4-8, Jurkat, A301), während andere humane Zelltypen (HeLa: Cervixcarcinom, TE671: Rhabdomyosarkom, HT1080: Fibrosarkom, 293T: Nierenmark) nicht transduziert wurden. Diese Ergebnisse zeigen, daß die 7A5-Vektoren eine hohe Selektivität für T-Zellen besitzt.

Eine erhöhte Selektivität für T-Zellen wurde auch für Zelltargeting-Vektoren gefunden, die eine DNA-Sequenz enthalten, die für ein einkettiges Antikörperfragment gemäß Figur 2, 3, 4 oder 5 codiert.

### Beispiel 3:

#### Transduktion von primären T-Zellen

Zur Transduktion von primären T-Zellen wurden aus Blut primäre humane PBMC ("periphere mononukleäre Zellen", die Isolierung von PBMC aus Blut mittels Sucrose-Dichtegradient-Zentrifugation erfolgt nach Standardtechniken) isoliert.

Nach dreitägiger Stimulierung mittels PHA (Phytohämagglutinin) und IL-2 bestand die Zellpopulation aus 98% T-Lymphozyten (ermittelt mittels FACS-Analyse mit einem Antikörper gegen den T-Zellmarker CD3 (Stand der Technik)).

Die Transduktion dieser Zellen mittels 7A5-Vektoren ergab eine Effizienz von 20% Vektor-positiver Zellen (oder ca.  $1 \times 10^5$  i.E./ml). Zum Vergleich wurden Transduktionsexperimente mit humanen B-Zellen durchgeführt. Diese konnten etwa fünf-fach schwächer (ca. 4%) transduziert werden als T-Zellen.

5

Stimulierter humane PBMC konnten ferner auch mit den K6- und 7B2-Vektoren (d.h. Vektoren, die das einkettige Antikörperfragment gemäß Fig. 2 oder 3 oder einen Teil hiervon kodieren,) transduziert werden. Dies jedoch mit einer etwa 10-fach niedrigeren Effizienz als mit den 7A5-Vektoren.

10

Literaturliste

ANDERSON; (1992) Human Gene Therapy. Science 256: 808-813

5

Chang H.K., Gendelman R., Lisziewicz J., Gallo R.C., Ensoli B. (1994). Block of HIV-1 infection by a combination of antisense tat RNA and TAR decoys: a strategy for control of HIV-1. Gene Therapy 1: 208-216

10

CHU, T.-H. and DORNBURG, R. (1995). Retroviral vector particles displaying the antigen-binding site of an antibody enable cell-type-specific gene transfer. J. Virol. 69, 2659-2663

15

CHU, T.-H. and DORNBURG, R. (1997). Toward highly efficient cell-type-specific gene-transfer with retroviral vectors displaying single-chain antibodies. J. Virol. 71, 720-725

20

CHU, T.-H.-T., MARTINEZ, I., SHEAY, W., DORNBURG R. (1994). Cell targeting with retroviral vector particles containing antibody-Envelope fusion proteins. Gene Therapie 1: 292-299

25

COSSET, F., MORLING, F., TAKEUCHI, Y., WEISS, R., COLLINS, M., RUSELL, S. (1995). Retroviral Retargeting by Envelopes Expressing an N-terminal Binding Domain. J. Virol 69, No. 10: 6314-632

25

Duan L., Zhu M., Bagasra O., Pomerantz R.J. (1995). Intracellular immunization against HIV-1 infection of human T lymphocytes: utility of anti-Rev single-chain variable fragments. Hum. Gene Ther. 6: 1561-1573

30

DORNBURG, R. (1995). Reticuloendoteliosis viruses and derived vectors. Gene Therapie 2: 1-10

ENGELSTÄDTER, M., BOBKOVA, M., BAIER, M., STITZ, J., HOLTKAMP, N., CHU, T.-H.-T., KURTH, R., DORNBURG, R., BUCHHOLZ, C. J., AND CICHUTEK, K. Targeting human T-cells by retroviral vectors displaying antibody domains selected from a phage display library. (submitted to Human Gene Therapy)

5

HUSTON, J. S., MUDGETT-HUNTER, M., TAI, M. S., MCCARTHNEY, J., WARREN, F., HABER, E., (1991). Protein engineering of single-Chain Fv proteins and fusion proteins. *Methods Enzymol.* 203:46-88

10

JIANG A., CHU, T.-H., NOCKEN, F., CICHUTEK, K., and DORNBURG, R. (1998). Cell-type specific gene transfer into human cells with retroviral vectors that display single-chain antibodies. *J. Virol.* 72, 10148-10156

15

KASAHARA, N., DOZY, A. M., YUET WAI KAN (1994). Tissue-Specific Targeting of Retroviral Vectors Through Ligand-Receptor Interactions. *Science* 266: 1373-1375

Leavitt M.C., Wong-Staal F., Looney D.J. (1996). Ex vivo transduction and expansion of CD4+ lymphocytes from HIV+ donors: a prelude to a ribozyme gene therapy trial. *Gene Ther.* 7: 599-606

20

Levy-Mintz P., Duan L., Zhang H., Hu B., Dornadula G., Zhu M., Kulkoski J., Bizub-Bender D., Skalka A.M., Pomeranz R.J. (1996). Intracellular expression of single-chain variable fragments to inhibit early stages of the viral life cycle by targeting human immunodeficiency virus type 1 integrase. *J. Virol.* 70: 8821-8832

25

Macchi P., Villa A., Giliani S., Sacco M.C., Frattini A., Port F., Ugazio A.G., Jonston J.A., Candotti F., O Shea J.J., Vezzoni P., Notarangelo L.D. (1995). Mutations of the JAK-3 gene in patients with autosomal severe combined immune deficiency (SCID). *Nature* 377: 65-68

30

MARTINEZ, I. and DORNBURG, R. (1995). Improved retroviral packaging cell lines derived from spleen necrosis virus. *Virology* 208, 234-241

5 MARTINEZ, I., DORNBURG, R. (1995). Mapping of Receptor Binding Domains in the Envelope Protein of Spleen Necrosis Virus. *J. Virol.* 69, No. 7

MIKAWA, T., FISCHMANN, D. A., DOUGHERTY, J. P., and BROWN, A. M. C. (1992). In vivo analysis of a new lacZ retrovirus vector suitable for lineage marking in avian and other species. *Exp. Cell Res.* 195, 516-523

10

MORGAN, R. A., Nussbaum, O., Muenchau, D.D., Shu, L., Coutre, L., Andeson, W.F. (1993). Analysis of the functional and the host range-determining regions of the murine ecotropic and amphotropic retrovirus envelope proteins. *J. Virol.* 67: 4712-4721

15 PARVEEN, Z., KRUPETZKI, A., POMERANTZ, R. J., ENGELSTÄDTER, M., CICHUTEK, K., AND DORNBURG, R. Genetically engineered c-type retroviral vectors, derived from spleen necrosis virus, SNV, capable of infecting quiescent cells. (submitted to *Nature Biotechnology*)

20 Ramenzani A., Ding S.F., Joshi S. (1997). Inhibition of HIV-1 replication by retroviral vectors expressing monomeric and multimeric hammerhead ribozymes. *Gene Ther.* 4: 861-867

25 RUSSEL, S. J., HAWKINS, R.E., WINTER, G. (1993). Retroviral vectors displaying functional antibody fragments. *Nucleic Acid Res.* 21: 1081-1985

SCHNIERLE, B. S., STITZ, J., BOSCH, V., NOCKEN, F., MERGET-MILLITZER, H., ENGELSTADTER, M., KURTH, R., GRONER, B., CICHUTEK, K. (1997). Pseudotyping of murine leukemia virus with the envelope glycoproteins of HIV generates a retroviral vector with specificity of infection for CD4-expressing cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(16):8640-8645.

30

97  
Smith C., Lee S.W., Wong E., Gallardo H., Page K., Gaspar O., Lebowski J., Gilboa E.  
(1996). Transient protection of human T-cells from human immunodeficiency virus type 1  
infection by transduction with adeno-associated viral vectors which express RNA decoys.  
Antiviral Res. 32: 99-115

5

WATANABE, S. AND TEMIN, H. M. (1983). Construction of a helper cell line for avian  
reticuloendotheliosis virus cloning vecotrs. Moll. Cell Biol. 3: 2241-2249

10

WEISS, R. (1993). Cellular receptors and viral glycoproteins involved in retroviral entry. In:  
J.A.Levy (ed.). The Retroviridae 2: 1-108

WHITLOW, M. AND FILPULA, D., (1991). Single-Chain Fv proteins and their fusion  
proteins. Methods: Acompanion to Methods Enzymol. 2:97-105

15

YU, J. S., BURWICK, J. A., DRANOFF, G., BREAKFIELD, X., (1997). Gene Therapy  
for metastatic Brain Tumors by Vaccination with Granulocyte-Macrophage-Colony-  
Stimulation Factor-Transduced Tumor Cells. H. Gene Therapy 8:1065-1072



# SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

- (i) ANMELDER:
  - (A) NAME: Bundesrepublik Deutschland, letztvertreten durch den Präsidenten des Paul-Ehrlich-Instituts, Prof. Kurth
  - (B) STRASSE: Paul-Ehrlichstrasse 51-59
  - (C) ORT: Langen
  - (D) BUNDESLAND: Hessen
  - (E) LAND: Deutschland
  - (F) POSTLEITZAHL: 63225

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Gentransfer in humane Lymphocyten mittels retroviraler scFv-Zelltargeting Vektoren

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 5

- (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:
  - (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
  - (B) COMPUTER: IBM PC compatible
  - (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
  - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 1030 Basenpaare
  - (B) ART: Nukleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Doppelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:1:

```

1 TCCACCACTCTCGACTCAAGAAAGCTCCTGACAACCAAGAAGA ATG GAC TGT CTC ACC AAC CTC CGA TCC 70
1 M D C L T N L R S 9
71 GCT GAG GGT AAA GTT GAC CAG GCG AGC AAA ATC CTA ATT CTC CTT GTG GCT TGG TGG GGG 130
10 A E G K V D Q A S K I L I L L V A W W G 29
131 TTT GGG ACC ACT GCC GAA GTT TCG ACT GCC CGA GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTC 190
30 F G T T A E V S T A R A A Q P A M A E V 49
191 AAG CTG CAG CAG TCA GGG GCT GAG CTG GTG AGG CCT GGG GTC TCA GTG AAG ATT TCC TGC 250
50 K L Q Q S G A E L V R P G V S V K I S C 69
251 AAG GGT TCT GGC TAC ACA TTC ACT GAT TAT GGT ATG AGC TGG GTG AAA CAG AGT CAT GCA 310
70 K G S G Y T F T D Y G M S W V K Q S H A 89
311 AAG AGT CTA GAG TGG ATT GGA CTT ATT AGT ACT TAC TAT GGT GAT CCT AGT TAC AAC CAG 370
90 K S L E W I G L I S T Y Y G D P S Y N Q 109
371 AGG TTC AAG GGC AAG GCC ACA ATG ACT GTA GAC AAA TCC TCC AAC ACA GCC TAT TTG GAA 430
110 R F K G K A T M T V D K S S N T A Y L E 129
431 CTT GCC AGA CTG ACA TCT GAG GAT TCT GCC ATT TAT TAT TGT GCA AGA TCG GAT GGT AAT 490
130 L A R L T S E D S A I Y Y C A R S D G N 149
491 TAC GGG TAT TAC TAT GCT TTG GAC TAC TGG GGC CAA GGC ACT ACG GTC ACC GTC TCC TCA 550
150 Y G Y Y Y A L D Y W G Q G T T V T V S S 169

```

551 GGT GGA GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAT ATC GAG CTC ACT 610  
 170 G G G G S G G G S G G G S D I E L T 189  
 611 CAG TCT CCA TCT TCT TTG GCT GTG TCT CTA GGG CAG AGG GCC ACC ATA TCC TGC AGA GCC 670  
 190 Q S P S S L A V S L G Q R A T I S C R A 209  
 671 AGT GAA AGT GTT GAT AGT TAT GGC GAT AGT TTT ATG CAC TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGA 730  
 210 S E S V D S Y G D S F M H W Y Q Q K P G 229  
 731 CAG CCA CCC AAA CTC CTC ATC TAT CGT GCA TCC AAC CTA GAA TCT GGA GTC CCT GCC AGG 790  
 230 Q P P K L L I Y R A S N L E S G V P A R 249  
 791 TTC AGT GGC AGT GGG TCT GAG TCA GAC TTC ACT CTC ACC ATC GAT CCT GTG GAG GAA GAT 850  
 250 F S G S G S E S D F T L T I D P V E E D 269  
 851 GAT GCT GCA GTG TAT TAC TGT CTG CAA AGT ATG GAA GAT CCG TAC ACG TTC GGA GGG GGG 910  
 270 D A A V Y Y C L Q S M E D P Y T F G G G 289  
 911 ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGG GCG GCC GCA TCG GGC TCC GGG GGC GGT GGT TCT GGT GGT 970  
 290 T K L E I K R A A A S G S G G G G S G G 309  
 971 GGT TCT GGT GGT GGT GGT TCT GGT GGT GGT GGT TCT GGC GCC AGC CCA GTC CAG TTT ATC 1030  
 310 G S G G G G S G G G G S G A S P V Q F I 329

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
 (A) LÄNGE: 927 Basenpaare  
 (B) ART: Nukleinsäure  
 (C) STRANGFORM: Doppelstrang  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:2:

1 ATG GAC TGT CTC ACC AAC CTC CGA TCC 27  
 1 M D C L T N L R S 9  
 28 GCT GAG GGT AAA GTT GAC CAG GCG AGC AAA ATC CTA ATT CTC CTT GTG GCT TGG TGG GGG 87  
 10 A E G K V D Q A S K I L I L L V A W W G 29  
 88 TTT GGG ACC ACT GCC GAA GTT TCG ACT GCC CGA GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTC 147  
 30 F G T T A E V S T A R A A Q P A M A E V 49  
 148 AAG CTG CAG GAG TCA GGG ACT GAA CTT GTG AAG CCT GGG GCT TCA GTG AAT CTG TCT TGC 207  
 50 K L Q E S G T E L V K P G A S V N L S C 69  
 208 AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTC ACC AGC TAC TGG ATG CAC TGG TTG AAG CAG AGG CCT GGA 267  
 70 K A S G Y T F T S Y W M H W L K Q R P G 89  
 268 CAA GGC CTT GAG TGG ATC GGA GAG ATT GAT CCT GTT GAT AGT TAT ACT AAC TAC AAT CAA 327  
 90 Q G L E W I G E I D P V D S Y T N Y N Q 109  
 328 AAC TTC AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT GTA GAC AAG TCC TCC ACC ACA GTC TAC ATG CAC 387  
 110 N F K G K A T L T V D K S S T T V Y M H 129  
 388 CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAC TGT GCA AGA AAG GGC TAT GCT 447  
 130 L S S L T S E D S A V Y Y C A R K G Y A 149  
 448 ATG GAC TAC TGG GGC CAA GGG ACC AAC GTC ACC GTC TCC TCA GGT GGA TGC GGT TCA GGC 507  
 150 M D Y W G Q G T N V T V S S G G C G S G 169  
 508 GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAC ATC GAG CTC ACT CAG TCA CCA GCA ATC ATG 567  
 170 G G G S G G G G S D I E L T Q S P A I M 189  
 568 TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG GTC ACC ATG ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT ATA AGT TAC 627  
 190 S A S P G E K V T M T C S A S S S I S Y 209  
 628 ATG CAC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGC ACC TCC CCC AAA AGA TGG ATT TAT GAC ACA TCC 687

210 M H W Q Q K P G T S P K W I Y D T S 229  
 688 AAA CTG GCT TCT GGA GTC CCT GCT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAT TCT 747  
 230 K L A S G V P A R F S G S G S G T S Y S 249  
 748 CTC CCA ATC AGC AGC ATG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAT CAG CGG AGT 807  
 250 L P I S S M E A E D A A T Y Y C H Q R S 269  
 808 AGT TAC CCA TGG ACG TTC GGT GGA GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGG GCG GCC GCA TCG 867  
 270 S Y P W T F G G G T K L E I K R A A A S 289  
 868 GGC TCC GGG GGC GGT GGT TCT GGT GGT GGT TCT GGT GGT GGT TCT GGT GGT GGT GGT 927  
 290 G S G G G G S G G G S G G G S G G G S G G G G 309

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 990 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:3:

ATG GAC TGT CTC ACC AAC CTC CGA TCC GCT GAG GGT AAA GTT GAC CAG GCG AGC AAA ATC 60  
 M D C L T N L R S A E G K V D Q A S K I 20  
 61 CTA ATT CTC CTT GTG GCT TGG TGG GGG TTT GGG ACC ACT GCC GAA GTT TCG ACT GCC CGA 120  
 21 L I L L V A W W G F G T T A E V S T A R 40  
 121 GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTG CAG CAG TCT GGG ACT GAA CTG GCA ACA 180  
 41 A A Q P A M A Q V Q L Q Q S G T E L A T 60  
 181 CCT GGG GCC TCA GTG AGG ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC GCC TTT ACT ACC TAC TGG 240  
 61 P G A S V R M S C K A S G Y A F T T Y W 80  
 241 ATG CAC TGG GTA AAA CAG AGG CCT GGA CAG GGT CTG GAA TGG ATT GGA TAC ATT AAT CCT 300  
 81 M H W V K Q R P G Q G L E W I G Y I N P 100  
 301 ACC ACT GAT TAT ACT GAC TAC AAT CTG AAG TTC AAG GAC AAG GCC ACA TTG ACT GCA GAC 360  
 101 T T D Y T D Y N L K F K D K A T L T A D 120  
 361 AAA TCC TCC AGT ACA GCC TAC ATG CAA CTG AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCA GTC 420  
 121 K S S S T A Y M Q L S S L T S E D S A V 140  
 421 TAT TAC TGT GCA AGA TCG GGG TGG TCC TAT GCT ATG GAC TAC TGG GGG CAA GGG ACC ACG 480  
 141 Y Y C A R S G W S Y A M D Y W G Q G T T 160  
 481 GTC ACC ATC TCC TCA GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG 540  
 161 V T I S S G G G G G G G S G G G G G S 180  
 541 GAC ATC GAG CTC ACT CAG TCT CCA GCA ATC ATG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG GTC ACC 600  
 181 D I E L T Q S P A I M S A S P G E K V T 200  
 601 ATA ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT GTA AGT TAC ATG CAC TGG TTC CAG CAG AAG CCA GGC 660  
 201 I T C S A S S S V S Y M H W F Q Q K P G 220  
 661 ACT TCT CCC AAA CTC TGG ATT TAT AGC ACA TCC AAC CTG GCT TCT GGA GTC CCT GCT CGC 720  
 221 T S P K L W I Y S T S N L A S G V P A R 240  
 721 TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC ACA ATC AGC CGA ATG GAG GCT GAA 780  
 241 F S G S G S G T S Y S L T I S R M E A E 260  
 781 GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAG CAA AGG AGT AGT TAC CCA TTC ACG TTC GGC TCG GGC 840  
 261 D A A T Y Y C Q Q R S S Y P F T F G S G 280  
 841 ACC AAG CTG GAA ATC AAA CGG GCG GCC GCA TCG GGC TCC GGG GGC GGT GGT TCT GGT GGT 900  
 281 T K L E I K R A A A S G S G G G G G S G G 300  
 901 GGT GGT TCT GGT GGT GGT GGT TCT GGT GGT GGT TCT GGC GCC AGC CCA GTC CAG TTT 960

301 G G S G G G S G G G S A S P V Q F 320  
 961 ATC CCC CTG CTT GTG GGT CTA GGG ATT TCA 990  
 321 I P L L V G L G I S 330

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 946 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:4:

1 ATG GAC TGT CTC ACC AAC CTC CGA TCC GCT GAG GGT AAA GTT GAC CAG GCG AGC AAA ATC 60  
 1 M D C L T N L R S A E G K V D Q A S K I 20  
 61 CTA ATT CTC CTT GTG GCT TGG TGG GGG TTT GGG ACC ACT GCC GAA GTT TCG ACT GCC CGA 120  
 21 L I L L V A W G F G T T A E V S T A R 40  
 121 GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTC AAG CTG CAG CAG TCA GGG GCT GAG CTG GTG AGG 180  
 41 A A Q P A M A E V K L Q Q S G A E L V R 60  
 181 CCT GGA GCT TCA GTG AAG CTG TCC TGC AAG ACT TCT GGC TTC TCC TTC ACC AGC TAC TGG 240  
 61 P G A S V K L S C K T S G F S F T S Y W 80  
 241 ATG AAC TGG GTG AAG CTG AGG CCT GGA CAA GGC CTT GAG TGG ATT GGC ATG ATT CAT CCT 300  
 81 M N W V K L R P G Q G L E W I G M I H P 100  
 301 TCC GAT AGT GAA ACT AGT TTA ACT CAG AGG TTC AAG GAC AAG GCC ACA CTG ACT GTA GAC 360  
 101 S D S E T S L T Q R F K D K A T L T V D 120  
 361 AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAA CTC AGC AGC CCG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC 420  
 121 K S S S T A Y M Q L S S P T S E D S A V 140  
 421 TAT TAC TGT GCA AGA TCT CTT TAT GCT AAC TAC CCC TCC TGG TTT ACT TAC TGG GGC CAA 480  
 141 Y Y C A R S L Y A N Y P S W F T Y W G Q 160  
 481 GGC ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT 540  
 161 G T T V T V S S G G G G S G G G S G G 180  
 541 GGC GGA TCG GAC ATC GAG CTC ACT CAG TCT CCA ACC ACC ATG GCT GCA TCT CCC GGG GAG 600  
 181 G G S D I E L T Q S P T T M A A S P G E 200  
 601 AAG ATC ACT ATC ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT ATA AGT TCC AAT TAC TTG CAT TGG TAT 660  
 201 K I T I T C S A S S S I S S N Y L H W Y 220  
 661 CAG CAG AAG CCA GGA TTC TCC CCT AAA CTC TTG ATT TAT AGG ACA TCC AAT CTG GCT TCT 720  
 221 Q Q K P G F S P K L L I Y R T S N L A S 240  
 721 GGA GTC CCA GCT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC ACA ATT GGC 780  
 241 G V P A R F S G S G S G T S Y S L T I G 260  
 781 ACC ATG GAG GCT GAA GAT GTT GCC ACT TAC TAC TGC CAG CAG GGT AGT AGT ATA CCG TAC 840  
 261 T M E A E D V A T Y Y C Q Q G S S I P Y 280  
 841 ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CCG GCG GCC GCA TCG GGC TCC GGG GGC 900  
 281 T F G G G T K L E I K R A A A S G S G G 300  
 901 GGT GGT TCT GGT GGT GGT GGT TCT GGT GGT GGT TCT GGT GGT G 946  
 301 G G S G G G G S G G G G S G G 315

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 906 Basenpaare

- (B) ART: Nukleinsäure  
(C) STRANGFORM: Doppelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:5:

ATG GAC TGT CTC ACC AAC CTC CGA TCC GCT GAG GGT AAA GTT GAC CAG GCG AGC AAA ATC	60
M D C L T N L R S A E G K V D Q A S K I	20
61 CTA ATT CTC CTT GTG GCT TGG TGG GGG TTT GGG ACC ACT GCC GAA GTT TCG ACT GCC CGA	120
21 L I L L V A W W G F G T T A E V S T A R	40
121 GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTA CAG CTG CAG CAG TCA GGA GCA GAA ATG AAA AAG	180
41 A A Q P A M A Q V Q L Q Q S G A E M K K	60
181 CCC GGG GAG TCT CTG AAA ATC TCC TGT AAG GGT TTT GGA TAC GAC TTT AGC ACC TAC TGG	240
61 P G E S L K I S C K G F G Y D F S T Y W	80
241 ATC GCC TGG GTG CGC CAG ATG CCC GGG AAA GGC CTG GAG TAC ATG GGG CTC ATC TAT CCT	300
81 I A W V R Q M P G K G L E Y M G L I Y P	100
301 GGT GAC TCT GAC ACC AAA TAC AGC CCG TCC TTC CAA GGC CAG GTC ACC ATC TCA GCC GAC	360
101 G D S D T K Y S P S F Q G Q V T I S A D	120
361 AAG TCC ATC AGC ACC GCC TAC CTG CAG TGG AGC AGC CTG AAG GCC TCG GAC ACC GCC ATG	420
121 K S I S T A Y L Q W S S L K A S D T A M	140
421 TAT TAC TGT GCG AGA GTC TCT GGA TAT TGT AGT AGT ACC AGC TGC TAT GAC TAC TAC TAC	480
141 Y Y C A R V S G Y C S S T S C Y D Y Y Y	160
481 TAC TAC ATG GAC GTC TGG GGC CGG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCG AGA GGT GGA GGC GGT	540
161 Y Y M D V W G R G T L V T V S R G G G G	180
541 TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAC ATC GTG ATG ACC CAG TCT CCT TCC	600
181 S G G G G S G G G G S D I V M T Q S P S	200
601 ACC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA GTC ACC ATG ACT TGC CGG GCC AGT CAG AAC ATT	660
201 T L S A S V G D R V T M T C R A S Q N I	220
661 AAT ATC TGG TTG GCC TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCC CCT AAG CTC CTG ATC TAT	720
221 N I W L A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y	240
721 AAG GCG TCC ACT TTA GAG AGT GGG GTC CCG TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA	780
241 K A S T L E S G V P S R F S G S G S G T	260
781 GAA TTC ACT CTC ACC ATC AGC GGC CTG CAG CCT GAT GAT TTT GCA AGT TAT TAC TGT CAA	840
261 E F T L T I S G L Q P D D F A S Y Y C Q	280
841 CGG TAT GAT AGT GAC TGG TCG TTC GGC CAA GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA CGT GCG GCC	900
281 R Y D S D W S F G Q G T K L E I K R A A	300
901 GCA TCG	906
301 A S	

## Patentansprüche

1. Zelltargeting-Vektor enthaltend eine DNA-Sequenz codierend ein einkettiges Antikörperfragment (single chain variable fragment, scFv) dadurch gekennzeichnet, daß das einkettige Antikörperfragment eine Aminosäuresequenz gemäß einer der Figuren 1 bis 5 hat.
2. Zelltargeting-Vektor gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor weiterhin eine DNA-Sequenz enthält, die einen SNV-env Leader gemäß einem der Figuren 1 bis 5 codiert.
3. Zelltargeting-Vektor gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor T-Zell-spezifisch ist.
4. Zelltargeting-Vektor gemäß einen der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor vom SNV (Milznekrosevirus) abgeleitet ist.
5. Zelltargeting-Vektor gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der von SNV abgeleitete Vektor pTC53 ist.
6. Zelltargeting-Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 5 enthaltend ein therapeutisches Gen.
7. Arzneimittel, enthaltend Zelltargeting-Vektoren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6.
8. Verwendung der Zelltargeting-Vektoren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Gentherapie, Impftherapie oder Diagnostik.
9. Verwendung der Zelltargeting-Vektoren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Therapie T-Zell-assoziiierter Krankheiten.

10. Verwendung gemäß Anspruch 7, wobei die T-Zell-assoziierte Krankheit erworbene Immunschwäche (AIDS) oder schwere kombinierte Immunschwäche (SCID) ist.

## 7A5-scFv

SNV- nv Leader

1 TCCACCACTCTCGACTCAAGAAAGCTCCTGACAACCAAGAAGA ATG GAC TGT CTC ACC AAC CTC CGA TCC 70  
 1 M D C L T N L R S 9

71 GCT GAG GGT AAA GTT GAC CAG GCG AGC AAA ATC CTA ATT CTC CTT GTG GCT TGG TGG GGG 130  
 10 A E G K V D Q A S K I L I L L V A W W G 29

Sfi I

131 TTT GGG ACC ACT GCC GAA GTT TCG ACT GCC CGA GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTC 190  
 30 F G T T A E V S T A R A A Q P A M A E V 49

191 AAG CTG CAG CAG TCA GGG GCT GAG CTG GTG AGG CCT GGG GTC TCA GTG AAG ATT TCC TGC 250  
 50 K L Q Q S G A E L V R P G V S V K I S C 69

251 AAG GGT TCT GGC TAC ACA TTC ACT GAT TAT GGT ATG AGC TGG GTG AAA CAG AGT CAT GCA 310  
 70 K G S G Y T F T D Y G M S W V K Q S H A 89

311 AAG AGT CTA GAG TGG ATT GGA CTT ATT AGT ACT TAC TAT GGT GAT CCT AGT TAC AAC CAG 370  
 90 K S L E W I G L I S T Y Y G D P S Y N Q 109

371 AGG TTC AAG GGC AAG GCC ACA ATG ACT GTA GAC AAA TCC TCC AAC ACA GCC TAT TTG GAA 430  
 110 R F K G K A T M T V D K S S N T A Y L E 129

431 CTT GCC AGA CTG ACA TCT GAG GAT TCT GCC ATT TAT TAT TGT GCA AGA TCG GAT GGT AAT 490  
 130 L A R L T S E D S A I Y Y C A R S D G N 149

491 TAC GGG TAT TAC TAT GCT TTG GAC TAC TGG GGC CAA GGC ACT ACG GTC ACC GTC TCC TCA 550  
 150 Y G Y Y Y A L D Y W G Q G T T V T V S S 169

551 GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAT ATC GAG CTC ACT 610  
 170 G G G G S G G G G S G G G G S D I E L T 189

611 CAG TCT CCA TCT TCT TTG GCT GTG TCT CTA GGG CAG AGG GCC ACC ATA TCC TGC AGA GCC 670  
 190 Q S P S S L A V S L G Q R A T I S C R A 209

671 AGT GAA AGT GTT GAT AGT TAT GGC GAT AGT TTT ATG CAC TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGA 730  
 210 S E S V D S Y G D S F M H W Y Q Q K P G 229

731 CAG CCA CCC AAA CTC CTC ATC TAT CGT GCA TCC AAC CTA GAA TCT GGA GTC CCT GCC AGG 790  
 230 Q P P K L L I Y R A S N L E S G V P A R 249

791 TTC AGT GGC AGT GGG TCT GAG TCA GAC TTC ACT CTC ACC ATC GAT CCT GTG GAG GAA GAT 850  
 250 F S G S G S E S D F T L T I D P V E E D 269

851 GAT GCT GCA GTG TAT TAC TGT CTG CAA AGT ATG GAA GAT CCG TAC ACG TTC GGA GGG GGG 910  
 270 D A A V Y Y C L Q S M E D P Y T F G G G 289

Not I

911 ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGG GCG GCC GCA TCG GGC TCC GGG GGC GGT GGT TCT GGT GGT 970  
 290 T K L E I K R A A A S G S G G G G S G G 309

971 GGT TCT GGT GGT GGT GGT TCT GGT GGT GGT GGT TCT GGC GCC AGC CCA GTC CAG TTT ATC 1030  
 310 G S G G G S G G G G S G A S P V Q F I 329

Fig. 1



## K6-sCFv

SNV-env Leader  
 ATG GAC TGT CTC ACC AAC CTC CGA TCC 27  
 M D C L T N L R S 9

1  
 1

28 GCT GAG GGT AAA GTT GAC CAG GCG AGC AAA ATC CTA ATT CTC CTT GTG GCT TGG TGG GGG 87  
 10 A E G K V D Q A S K I L I L L V A W W G 29

88 TTT GGG ACC ACT GCC GAA GTT TCG ACT GCC CGA GCG GCC CAG CCG GCC 147  
 30 F G T T A E V S T A R A A Q P A M A E V 49

148 AAG CTG CAG GAG TCA GGG ACT GAA CTT GTG AAG CCT GGG GCT TCA GTG AAT CTG TCT TGC 207  
 50 K L Q E S G T E L V K P G A S V N L S C 69

208 AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTC ACC AGC TAC TGG ATG CAC TGG TTG AAG CAG AGG CCT GGA 267  
 70 K A S G Y T F T S Y W M H W L K Q R P G 89

268 CAA GGC CTT GAG TGG ATC GGA GAG ATT GAT CCT GTT GAT AGT TAT ACT AAC TAC AAT CAA 327  
 90 Q G L E W I G E I D P V D S Y T N Y N Q 109

328 AAC TTC AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT GTA GAC AAG TCC TCC ACC ACA GTC TAC ATG CAC 387  
 110 N F K G K A T L T V D K S S T T V Y M H 129

388 CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAC TGT GCA AGA AAG GGC TAT GCT 447  
 130 L S S L T S E D S A V Y Y C A R K G Y A 149

448 ATG GAC TAC TGG GGC CAA GGG ACC AAC GTC ACC GTC TCC TCA GGT GGA TGC GGT TCA GGC 507  
 150 M D Y W G Q G T N V T V S S G G C G S G 169

508 GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAC ATC GAG CTC ACT CAG TCA CCA GCA ATC ATG 567  
 170 G G G S G G G S D I E L T Q S P A I M 189

568 TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG GTC ACC ATG ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT ATA AGT TAC 627  
 190 S A S P G E K V T M T C S A S S S I S Y 209

628 ATG CAC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGC ACC TCC CCC AAA AGA TGG ATT TAT GAC ACA TCC 687  
 210 M H W Y Q Q K P G T S P K R W I Y D T S 229

688 AAA CTG GCT TCT GGA GTC CCT GCT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAT TCT 747  
 230 K L A S G V P A R F S G S G S G T S Y S 249

748 CTC CCA ATC AGC AGC ATG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAT CAG CGG AGT 807  
 250 L P I S S M E A E D A A T Y Y C H Q R S 269

808 AGT TAC CCA TGG ACG TTC GGT GGA GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGG GCG GCC GCA TCG 867  
 270 S Y P W T F G G G T K L E I K R A A A S 289

868 GGC TCC GGG GGC GGT GGT TCT GGT GGT GGT GGT TCT GGT GGT GGT GGT 927  
 290 G S G G G S G G G S G G G S G G G S G G G G 309

Fig. 2

## 7B2-scFv

▶ SNV-env Leader  
 1 ATG GAC TGT CTC ACC AAC CTC CGA TCC GCT GAG GGT AAA GTT GAC CAG GCG AGC AAA ATC 60  
 1 M D C L T N L R S A E G K V D Q A S K I 20  
 61 CTA ATT CTC CTT GTG GCT TGG TGG GGG TTT GGG ACC ACT GCC GAA GTT TCG ACT GCC CGA 120  
 21 L I L L V A W W G F G T T A E V S T A R 40  
 Sfi I  
 121 GCG GCG CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTG CAG CAG TCT GGG ACT GAA CTG GCA ACA 180  
 41 A A Q P A M A Q V Q L Q Q S G T E L A T 60  
 181 CCT GGG GCC TCA GTG AGG ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC GCC TTT ACT ACC TAC TGG 240  
 61 P G A S V R M S C K A S G Y A F T T Y W 80  
 241 ATG CAC TGG GTA AAA CAG AGG CCT GGA CAG GGT CTG GAA TGG ATT GGA TAC ATT AAT CCT 300  
 31 M H W V K Q R P G Q G L E W I G Y I N P 100  
 301 ACC ACT GAT TAT ACT GAC TAC AAT CTG AAG TTC AAG GAC AAG GCC ACA TTG ACT GCA GAC 360  
 101 T T D Y T D Y N L K F K D K A T L T A D 120  
 361 AAA TCC TCC AGT ACA GCC TAC ATG CAA CTG AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCA GTC 420  
 121 K S S S T A Y M Q L S S L T S E D S A V 140  
 421 TAT TAC TGT GCA AGA TCG GGG TGG TCC TAT GCT ATG GAC TAC TGG GGG CAA GGG ACC ACG 480  
 141 Y A Y C A A R A S G W S Y A M D Y W G Q G T T 160  
 481 GTC ACC ATC TCC TCA GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG 540  
 161 V T I S S G G G G S G G G G S G G G S 180  
 541 GAC ATC GAG CTC ACT CAG TCT CCA GCA ATC ATG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG GTC ACC 600  
 181 D I E L T Q S P A I M S A S P G E K V T 200  
 601 ATA ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT GTA AGT TAC ATG CAC TGG TTC CAG CAG AAG CCA GGC 660  
 201 I T C S A S S S V S Y M H W F Q Q K P G 220  
 661 ACT TCT CCC AAA CTC TGG ATT TAT AGC ACA TCC AAC CTG GCT TCT GGA GTC CCT GCT CGC 720  
 221 T S P K L W I Y S T S N L A S G V P A R 240  
 721 TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC ACA ATC AGC CGA ATG GAG GCT GAA 780  
 241 F S G S G S G T S Y S L T I S R M E A E 260  
 781 GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAG CAA AGG AGT AGT TAC CCA TTC ACG TTC GGC TCG GGC 840  
 261 D A A T Y Y C Q Q R S S Y P F T F G S G 280  
 Not I  
 841 ACC AAG CTG GAA ATC AAA CCG GCG GCC GCA TCG GGC TCC GGG GGC GGT GGT TCT GGT GGT 900  
 281 T K L E I K R A A A S G S G G G S G G 300  
 901 GGT GGT TCT GGT GGT GGT GGT TCT GGT GGT GGT TCT GGC GCC AGC CCA GTC CAG TTT 960  
 301 G G S G G G S G G G S G A S P V Q F 320  
 961 ATC CCC CTG CTT GTG GGT CTA GGG ATT TCA  
 321 I P L L V G L G I S 330

Fig. 3

## 7E4 - scFv

▶ SNV-env Leader  
 1 ATG GAC TGT CTC ACC AAC CTC CGA TCC GCT GAG GGT AAA GTT GAC CAG GCG AGC AAA ATC 60  
 1 M D C L T N L R S A E G K V D Q A S K I 20  
 61 CTA ATT CTC CTT GTG GCT TGG TGG GGG TTT GGG ACC ACT GCC GAA GTT TCG ACT GCC CGA 120  
 21 L I L L V A W W G F G T T A E V S T A R 40  
 121 GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTC AAG CTG CAG CAG TCA GGG GCT GAG CTG GTG AGG 180  
 41 A A Q P A M A E V K L Q Q S G A E L V R 60  
 181 CCT GGA GCT TCA GTG AAG CTG TCC TGC AAG ACT TCT GGC TTC TCC TTC ACC AGC TAC TGG 240  
 61 P G A S V K L S C K T S G F S F T S Y W 80  
 241 ATG AAC TGG GTG AAG CTG AGG CCT GGA CAA GGC CTT GAG TGG ATT GGC ATG ATT CAT CCT 300  
 81 M N W V K L R P G Q G L E W I G M I H P 100  
 301 TCC GAT AGT GAA ACT AGT TTA ACT CAG AGG TTC AAG GAC AAG GCC ACA CTG ACT GTA GAC 360  
 101 S D S E T S L T Q R F K D K A T L T V D 120  
 361 AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAA CTC AGC AGC CCG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC 420  
 121 K S S S T A Y M Q L S S P T S E D S A V 140  
 421 TAT TAC TGT GCA AGA TCT CTT TAT GCT AAC TAC CCC TCC TGG TTT ACT TAC TGG GGC CAA 480  
 141 Y Y C A R S L Y A N Y P S W F T Y W G Q 160  
 481 GGC ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT 540  
 161 G T T V T V S S G G G S G G G G S G G 180  
 541 GGC GGA TCG GAC ATC GAG CTC ACT CAG TCT CCA ACC ACC ATG GCT GCA TCT CCC GGG GAG 600  
 181 G G S D I E L T Q S P T T M A A S P G E 200  
 601 AAG ATC ACT ATC ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT ATA AGT TCC AAT TAC TTG CAT TGG TAT 660  
 201 K I T I T C S A S S I S S N Y L H W Y 220  
 661 CAG CAG AAG CCA GGA TTC TCC CCT AAA CTC TTG ATT TAT AGG ACA TCC AAT CTG GCT TCT 720  
 221 Q Q K P G F S P K L L I Y R T S N L A S 240  
 721 GGA GTC CCA GCT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC ACA ATT GGC 780  
 241 G V P A R F S G S G S G T S Y S L T I G 260  
 781 ACC ATG GAG GCT GAA GAT GTT GCC ACT TAC TAC TGC CAG CAG GGT AGT AGT ATA CCG TAC 840  
 261 T M E A E D V A T Y Y C Q Q G S S I P Y 280  
 841 ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGG GCG GCC GCA TCG GGC TCC GGG GGC 900  
 281 T F G G G T K L E I K R A A A S G S G G 300  
 901 GGT GGT TCT GGT GGT GGT GGT TCT GGT GGT GGT TCT GGT GGT G 946  
 301 G G S G G G S G G G G S G G 315

Fig. 4

## 6C3-scFv

## ▶ SNV-env Leader

1	ATG	GAC	TGT	CTC	ACC	AAC	CTC	CGA	TCC	GCT	GAG	GGT	AAA	GTT	GAC	CAG	GCG	AGC	AAA	ATC	60
1	M	D	C	L	T	N	L	R	S	A	E	G	K	V	D	Q	A	S	K	I	20
61	CTA	ATT	CTC	CTT	GTG	GCT	TGG	TGG	GGG	TTT	GGG	ACC	ACT	GCC	GAA	GTT	TCG	ACT	GCC	CGA	120
21	L	I	L	L	V	A	W	W	G	F	G	T	T	A	E	V	S	T	A	R	40
121	GCG	GCC	CAG	CCG	GCC	ATG	GCC	CAG	GTA	CAG	CTG	CAG	CAG	TCA	GGA	GCA	GAA	ATG	AAA	AAG	180
41	A	A	Q	P	A	M	A	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	A	E	M	K	K	60
181	CCC	GGG	GAG	TCT	CTG	AAA	ATC	TCC	TGT	AAG	GGT	TTT	GGA	TAC	GAC	TTT	AGC	ACC	TAC	TGG	240
61	P	G	E	S	L	K	I	S	C	K	G	F	G	Y	D	F	S	T	Y	W	80
241	ATC	GCC	TGG	GTG	CGC	CAG	ATG	CCC	GGG	AAA	GGC	CTG	GAG	TAC	ATG	GGG	CTC	ATC	TAT	CCT	300
81	I	A	W	V	R	Q	M	P	G	K	G	L	E	Y	M	G	L	I	Y	P	100
301	GGT	GAC	TCT	GAC	ACC	AAA	TAC	AGC	CCG	TCC	TTC	CAA	GGC	CAG	GTC	ACC	ATC	TCA	GCC	GAC	360
101	G	D	S	D	T	K	Y	S	P	S	F	Q	G	Q	V	T	I	S	A	D	120
361	AAG	TCC	ATC	AGC	ACC	GCC	TAC	CTG	CAG	TGG	AGC	AGC	CTG	AAG	GCC	TCG	GAC	ACC	GCC	ATG	420
121	K	S	I	S	T	A	Y	L	Q	W	S	S	L	K	A	S	D	T	A	M	140
421	TAT	TAC	TGT	GCG	AGA	GTC	TCT	GGA	TAT	TGT	AGT	AGT	ACC	AGC	TGC	TAT	GAC	TAC	TAC	TAC	480
141	Y	Y	C	A	R	V	S	G	Y	C	S	S	T	S	C	Y	D	Y	Y	Y	160
481	TAC	TAC	ATG	GAC	GTC	TGG	GGC	CGG	GGA	ACC	CTG	GTC	ACC	GTC	TCG	AGA	GGT	GGA	GGC	GGT	540
161	Y	Y	M	D	V	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S	R	G	G	G	G	180
541	TCA	GGC	GGA	GGT	GGC	TCT	GGC	GGT	GGC	GGA	TCG	GAC	ATC	GTG	ATG	ACC	CAG	TCT	CCT	TCC	600
181	S	G	G	G	G	S	G	G	G	G	S	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	200
601	ACC	CTG	TCT	GCA	TCT	GTA	GGA	GAC	AGA	GTC	ACC	ATG	ACT	TGC	CGG	GCC	AGT	CAG	AAC	ATT	660
201	T	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	M	T	C	R	A	S	Q	N	I	220
661	AAT	ATC	TGG	TTG	GCC	TGG	TAT	CAG	CAG	AAA	CCA	GGG	AAA	GCC	CCT	AAG	CTC	CTG	ATC	TAT	720
221	N	I	W	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	240
721	AAG	GCG	TCC	ACT	TTA	GAG	AGT	GGG	GTC	CCG	TCA	AGG	TTC	AGC	GGC	AGT	GGA	TCT	GGG	ACA	780
241	K	A	S	T	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	260
781	GAA	TTC	ACT	CTC	ACC	ATC	AGC	GGC	CTG	CAG	CCT	GAT	GAT	TTT	GCA	AGT	TAT	TAC	TGT	CAA	840
261	E	F	T	L	T	I	S	G	L	Q	P	D	D	F	A	S	Y	Y	C	Q	280
841	CGG	TAT	GAT	AGT	GAC	TGG	TCG	TTC	GGC	CAA	GGG	ACC	AAG	CTG	GAG	ATC	AAA	CGT	GCG	GCC	900
281	R	Y	D	S	D	W	S	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K	R	A	A	300
901	GCA	TCG																			906
301	A	S																			302

Fig. 5